

明細書

アスコピロンPの効率的な製造方法

技術分野

5 本発明はアスコピロンP (2-hydroxymethyl-5-hydroxy-2, 3-dihydro-4H-pyran-4-one) の効率的な製造方法に関する。

背景技術

10 アスコピロンP (構造式: 図1) は、1978年にセルロースの熱分解により生成することが初めて報告され (Shafizadeh, F., et al., Carbohydr. Res. 67, 433-447 (1978) 参照)、その後、¹H-NMRおよび¹³C-NMR、赤外線分光法 (IR) により構造が解析され、三次元構造が明らかにされた。

15 アスコピロンP (以下、APPという) は、抗酸化能、抗菌能さらに褐色変化防止能を有することが報告されており (WO 00/56838、WO 02/26060、WO 02/26061参照)、昨今、その非常に高い機能性に期待が高まっている物質である。また自然界ではある種の真菌類が生産することも報告されている (M. -A. Baute, phytochemistry, 33, 41-45 (1993) 参照)。

APPの調製方法に関してはいくつかの報告がある。セルロースの熱分解による方法では、APPの収率が原料であるセルロースに対して僅か1.4%程度と低く、さらに、その後の精製に非常に複雑な分離工程が必要なため、工業的な生産には本方法は現実的ではない。また、1, 5-D-アンヒドロフルクトース (以下、1, 5-AFという) を強アルカリ条件下にすると、多数の化合物が生成し、その化合物が生成される過程の中間物質の一つがAPPであることが報告されている (Ahmand, T., PhD Thesis, The Swedish University of Agricultural Sciences, S

wed en (1995) 参照)。しかし、この条件下ではAPPは中間体であり、その反応をAPPで停止させる方法やAPPの調製法に関しては記述されていない。

APPは真菌類のPezizales目(例えば、Picaria leio
5 carpaおよびAnthracobia melaloma)ならびにTuberaleles目(例えばTuber melanosporum)の菌体抽出液を1, 5-AFに作用させ生合成できることも報告されているが、この方法はミリグラム単位での調製しか行われていない。この調製方法は、かなりの手間や時間を要するにも関わらず低収率であり、効率も悪いため、産業上利用できるもの
10 ではなかった。

最近では、酵素を用いたAPPの生産方法として、生産条件を詳細に設定した方法が特許出願されている(WO 03/038085, WO 03/038107, WO 03/038084参照)。しかし、この方法では酵素反応に長時間を要するうえ、酵素生産にも時間を費やす必要がある。

一方、1, 5-AFは、澱粉などの α -1, 4-グルカンを α -1, 4-グルカヌリニアーゼで分解することによって調製できる糖質であり、安価に大量に生産できる。この糖質については抗菌剤(特開2001-89377号公報参照)、抗酸化剤(特表平9-505988号公報参照)および着色剤(特開2002-27945号公報参照)としての利用について既に提案されている。

20

発明の開示

本発明の目的は、APPの効率的な製造方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的および利点は、以下の説明から明らかになろう。

本発明者らは、1, 5-AFおよびAPPについて鋭意研究を重ねた結果、1,
25 5-AFを高温で一定時間加熱することにより、容易にAPPを調製できることを発見し、その究明事実に基づき本発明に到達した。

すなわち、本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第1に、1, 5-AFをpH1.0以下で100℃以上の温度で、加熱することを特徴とする、A

P P の製造方法によって達成される。

さらに、本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第2に、1, 5-A Fを抗酸化剤の共存下で加熱することを特徴とする、A P Pの効率的な製造方法によって達成される。

5 本発明法によれば、1, 5-D-アンヒドロフルクトース溶液をp H 1 0以下の条件下において、加熱することで、アスコピロンPを従来の方法よりも非常に効率良く、かつ安価に製造することが可能である。

図面の簡単な説明

10 図1はアスコピロンP (2-Hydroxymethyl-5-hydroxy-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one)の構造式である。

図2は1, 5-A F水溶液を125°C、135°C、145°C、155°Cでそれぞれ加熱した際の加熱時間とA P P生成率の関係である。

15 図3は1, 5-A F水溶液をp H調整後加熱処理した際のA P P生成率の比較である。

図4は1, 5-A F水溶液(p H 3. 4)を120°Cの温度で加熱した際の加熱時間とA P P生成率の関係である。

図5は1, 5-A F水溶液(p H 3. 4)を150°Cの温度で加熱した際の加熱時間とA P P生成率の関係である。

20 図6は1, 5-A F水溶液(p H 3. 4)を170°Cの温度で加熱した際の加熱時間とA P P生成率の関係である。

図7は1, 5-A F水溶液にアスコルビン酸1%を添加して加熱した際のA P P生成率である。

25 発明の好ましい実施の形態

本発明の製造方法で用いられる1, 5-A Fは、例えば、紅藻オゴノリから抽出・精製した α -1, 4-グルカンリアーゼと澱粉あるいは澱粉分解物を反応させることにより調製可能である。

かくして調製された1, 5-A F含有溶液は、さらに分離・精製を行い、例えば、1, 5-A F含量99%以上の高純度溶液とすることができる。また、特に分離・精製を行わずに、例えば、1, 5-A F含量40%の溶液をそのまま使用してもよい。

5 加熱条件とA P Pの生成率の関係は、1, 5-A F溶液を加熱して得られた溶液について、A P P生成率を調べて求めることができる。

A P P生成率は以下の要領で算出する。

減圧下で乾燥させたA P Pを用いて調製した標準溶液について表1に記載の条件で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析を行い、得られたクロマトグラムにおけるA P Pのピーク面積を基に、測定試料(本発明の製法で製造したA P P含有溶液)のHPLCクロマトグラムにおけるA P Pのピーク面積より生成されたA P P量を算出する。A P P生成率は加熱処理に使用した1, 5-A Fの量に対して得られたA P Pの生成量の重量%を算出することで求められる。

15

表1

使用カラム：分離モード	配位子交換
カラム温度	30°C
流速	1.0 ml/min
溶離液	蒸留水
検出器	示差屈折計

本発明におけるA P Pの製造法では、1, 5-A F溶液をpH10以下の条件下で100°C以上の温度で加熱する。pHがそれよりも高くなるとA P Pは生成されるが、多数の副産物が生成する為、A P Pの分離、精製が非常に困難となる。好みの条件としてはpH2ないし7未満であり、A P Pの安定性等を考慮すると、より好ましくはpH2ないし4である。

本発明のA P P製造法における加熱条件としては、120°C以上の温度が好ましく、より好ましくは140~250°Cである。また、加熱時間は加熱温度や加熱方法によっても異なるが、例えば100°C以上で1秒~24時間であり、好ま

しくは120℃以上で1秒～5時間、より好ましくは、140～250℃で1秒～2時間程度である。

加熱方法としては、各種加熱機器が挙げられる。例えば、加熱機器として加圧蒸気殺菌器、ジェットクッカー、オイルバス等があり、その加熱媒体としては、
5 各種のオイル、蒸気、過熱水蒸気等がある。

1, 5-AFを溶解する溶媒としては、例えば、水あるいは水と水混和性有機溶媒との混合物を挙げることができる。水混和性有機溶媒としては、例えば、炭素数1～3の低級アルコール等が挙げられる。

溶媒中における1, 5-AFの濃度は、例えば0.1～90重量%とすること
10 ができる。

また、本発明者らは、APPが抗酸化剤共存下で安定化する傾向があることを見出した。従って、1, 5-AF溶液に他の抗酸化剤を添加して加熱処理を行うことで更に効率よくAPPを製造することができる。他の抗酸化剤としては、例えば、アスコルビン酸、エリソルビン酸、エチレンジアミン四酢酸およびそれらの塩類、トコフェロール、ブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシトルエン、ポリフェノール類が挙げられるが、なかでもアスコルビン酸、エリソルビン酸、エチレンジアミン四酢酸およびそれらの塩類が好ましい。
15

かくして、上述の方法によって得られたAPP含有溶液よりAPPを精製するためには、例えば、クロマトグラフィーにより分離精製を行うことができる。分離精製後、凍結乾燥により得られたAPP粉末について、電子衝撃イオン化法による質量分析法を用いて分析したところ、m/z 144に分子イオン (M^+) が観測された。また、同じ試料を重水に溶解し、¹H-NMR法および¹³C-NMR法を用いて分析したところ、表2に記載された結果が得られた。これらの質量分析とNMRの値は既に報告されているAPPのそれらの値 (M. -A. Baute, phytochemistry, 33, 41-45 (1993) 参照) と一致し、本発明の方法で製造された物質が図1に記載の構造を有し、APPであることが確認された。
20
25

表 2

帰属	¹³ Cシフト (ppm)	¹ Hシフト (ppm)	スピノン結合定数 J(Hz)
C-2	80. 3	4. 58	
C-3	36. 9	2. 52, 2. 88	$J_{3,3}=17.3$ $J_{2,3}=15.1$ $J_{2,3}=3.4$
C-4	192. 0	—	
C-5	135. 3	—	
C-6	152. 1	7. 54	
C-7	63. 0	3. 79, 3. 89	$J_{7,7}=12.8$, $J_{2,7}=5.6, 2.4$

本発明の製造方法により得られたアスコピロンPは、食品工業、医薬品工業、化学工業などで利用可能である。利用方法としては、例えば、アスコピロンPを食品の原料または製品に添加することが可能である。また、別の方法として、製品に1, 5-A Fを添加し、食品の製造工程中に本発明方法を実施することも可能である。例えば、食品の製造工程では往々にして、調理、殺菌などの加熱処理工程が存在する。従って、食品原料に予め1, 5-A Fを添加しておき、本発明の条件にて加熱することで、食品中でのアスコピロンPの製造が行われる。

以下、実施例により本発明を更に詳述する。本発明は、これらによって何ら限定されるものではない。

実施例

実施例 1

1, 5-A F（純度99%）を水に溶解して濃度10%の水溶液を調製し、加圧加熱殺菌器を用いて125°C、135°C、145°C、155°Cでそれぞれ加熱し、各温度における加熱時間とAPP生成率の関係を調べた。その結果、図2に示すように、これらの加熱条件で1, 5-A FからAPPが生成すること、さらに加熱温度125°Cから155°Cの範囲では155°Cが最も生成率が高いことが明らかとなった。また、過度に加熱を行うと、一旦生成されたAPPが分解し、結果的に収率が低減することも判った。以上の結果から、1, 5-A Fを高温で

一定時間加熱することにより、短時間で効率良くAPPを調製できることが明らかとなった。

実施例 2

濃度10%の1, 5-AF水溶液を下記表3に記載のpH調整剤でpH1~15まで調整した試料を121°C、30分間オートクレーブで加熱し、APP生成に対するpHの影響を調べた。結果を図3に示す。

表3

pH	pH調整剤
1. 0	塩酸
3. 0	酢酸緩衝液
5. 0	酢酸緩衝液
7. 0	りん酸緩衝液
9. 0	炭酸緩衝液
11. 0	水酸化ナトリウム水溶液
13. 0	水酸化ナトリウム水溶液

10 試験結果より、pH条件がAPPの生成に大きく影響し、特に酸性条件下で効率よく生成されることが明らかとなった。

実施例 3

抗酸化剤の共存下で1, 5-AFを加熱した。濃度10%の1, 5-AF（純度99%）水溶液に表4に記載の濃度で抗酸化剤を添加し、加圧加熱殺菌器を用いて145°Cで15分間加熱したところ、抗酸化剤を添加したほうがAPP生成率が高くなった。

表4

試験区	APP生成率 (%)
無添加 (AFのみ)	38
アスコルビン酸 1%	53
EDTA-Na 0.1%	42
アスコルビン酸 1% EDTA-Na 0.1%	53

実施例 4

酢酸緩衝液を用いてpH 3.0に調整した濃度10%の1,5-AF水溶液をオートクレーブにて121℃で30分間、60分間それぞれ加熱しAPP生成率を確認した。その結果を表5に示す。

5

表5

加熱時間(分)	APP生成率(%)
30	36
60	45

10 実施例 5

酢酸緩衝液を用いてpH 3.4に調整した濃度10%の1,5-AF溶液をステンレス製の耐圧容器に充填し、120℃、150℃、170℃のオイルバス中でそれぞれ一定時間加熱した後、APP生成率を確認した。結果を図4、5および6に示した。図6の結果のとおり、170℃、5分間の加熱で約35%のAPPが生成された。また、それぞれの加熱温度において適した加熱時間があり、効率のよい加熱条件が明らかとなった。

15 実施例 6

酢酸緩衝液を用いてpH 3.0に調整した濃度30%の1,5-AF水溶液をステンレス製の耐圧容器に入れ160℃、180℃および200℃のオイルバス20 中でそれぞれ3分間加熱してAPPを調製した。その結果を表6に示す。

表6

温度	APP生成率(%)
160℃	9.6
180℃	22.2
200℃	31.4

実施例 7

酢酸緩衝液を用いて pH 3.5 に調整した濃度 10 % の 1, 5-AF 水溶液に抗酸化剤を表 7 に記載の濃度で添加し、ステンレス製の耐圧容器に入れ密閉し、125 °C のオイルバス中で、30 分間加熱し、APP を調製した。その結果、
5 スコルビン酸を添加したものは、無添加区の約 2 倍の APP が生成された。

表 7

試験区	APP 生成率 (%)
無添加	10.7
アスコルビン酸 1 %	21.3
クロロゲン酸 1 %	13.9

10

実施例 8

濃度 10 % の 1, 5-AF 水溶液と濃度 10 % の 1, 5-AF 水溶液にアスコルビン酸を 1 % 添加したものをステンレス製の耐圧容器に入れ、180 °C のオイルバス中で 3 ~ 15 分間加熱した。その時の APP 生成率を図 7 に示す。アスコ
15 ルビン酸添加区で 3 分間加熱した場合、1, 5-AF の約 40 % が APP に変換されており最も生成率が高かった。

実施例 9

市販のルウを使用して、カレーを調理した。1, 5-AF を 0.1 % 添加し、真空パックした後 135 °C、5 分間加熱殺菌した。冷却後、カレーの中の APP
20 含有量を測定したところカレー全体の 0.01 % 含まれていることが判った。

10

請 求 の 範 囲

1. 1, 5-D-アンヒドロフルクトースの溶液をpH10以下で100°C以上の温度で加熱することを特徴とする、アスコピロンPの製造方法。

5

2. 加熱を120°C以上の温度で行う請求項1に記載の方法。

3. 加熱を1秒ないし24時間行う請求項1に記載の方法。

10 4. pH10以下がpH2ないし7未満である請求項1に記載の方法。

5. pH10以下がpH2ないし4である請求項1に記載の方法。

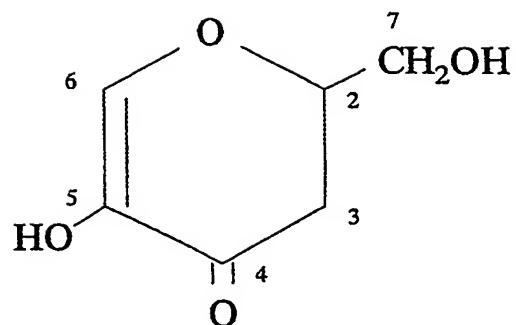
6. 加熱を抗酸化剤の存在下で行う請求項1に記載の方法。

15

7. 抗酸化剤が、アスコルビン酸、エリソルビン酸、エチレンジアミン四酢酸およびそれらの塩類よりなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項6に記載の方法。

1 / 3

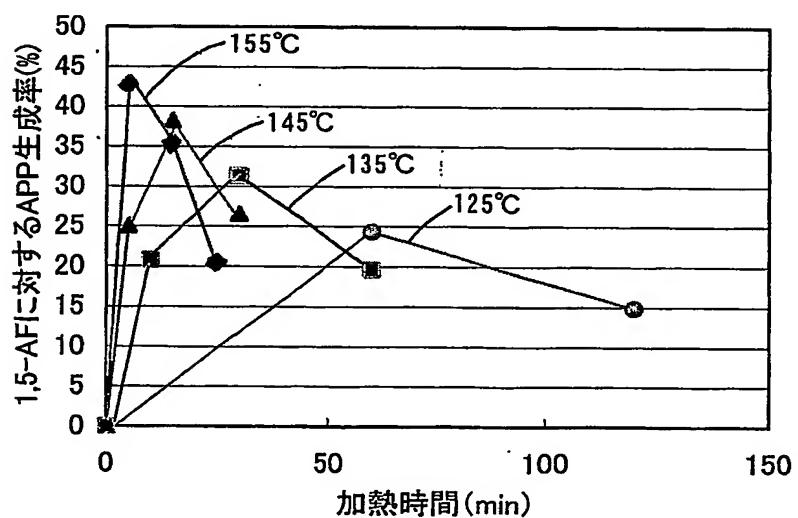
図 1



2-Hydroxymethyl-5-hydroxy-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one

図 2

加熱処理によるAPP生成率



2 / 3

図 3

pH調整によるAPP生成率への影響

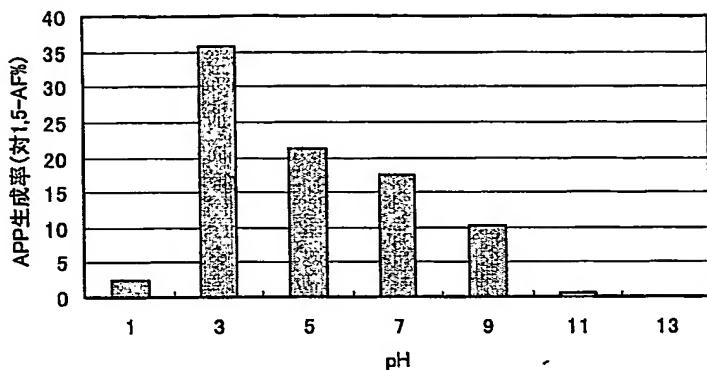


図 4

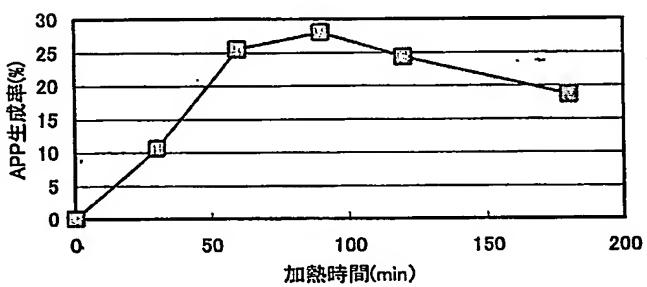
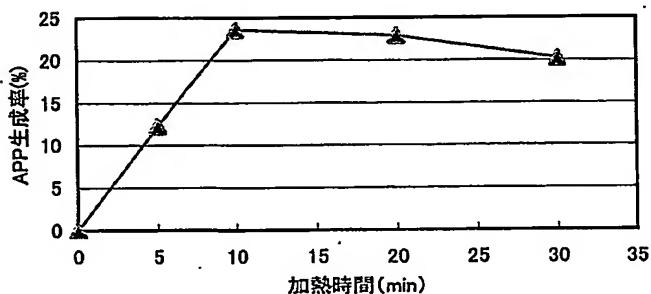


図 5



3 / 3

図 6

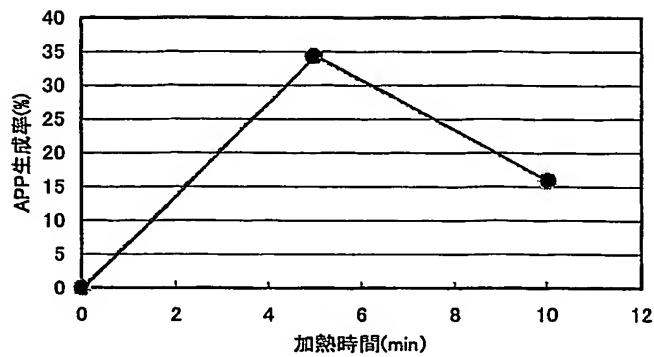
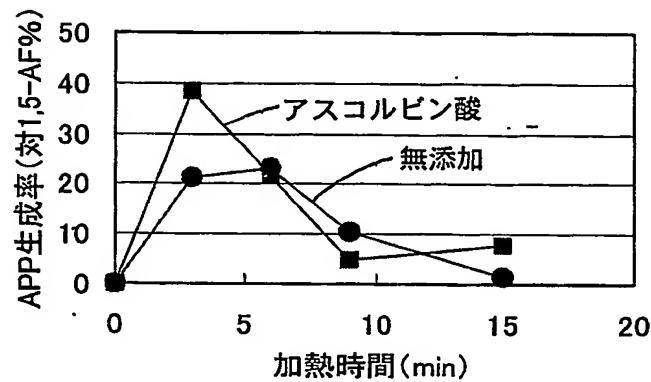


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07D309/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07D309/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY, CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2002/26060 A1 (DANISCO A/S), 04 April, 2002 (04.04.02), Full text; particularly, page 9, line 23 to page 10, line 4; page 12, lines 9 to 18 & US 2003/203963 A1	1-5 6,7
A	Stefan Freimund, S.K., 'Dimeric structures of 1,5-anhydro-D-fructose', Carbohydr.Res.1998, Vol.308, pages 195 to 200	1-7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 February, 2005 (10.02.05)Date of mailing of the international search report
01 March, 2005 (01.03.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. C1' C07D309/32

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. C1' C07D309/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
REGISTRY, CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2002/26060 A1 (DANISCO A/S) 2002.0	1-5
A	4. 04 全文 特に9頁23行～10頁4行、12頁9～18行 & US 2003/203963 A1	6, 7
A	Stefan Freimund, S. K. 'Dimeric structures of 1,5-anhydro-D-fructose' Carbohydr. Res. 1998, Vol. 308, pp. 195-200	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.02.2005

国際調査報告の発送日

01.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

渕野 留香

4 P 9048

電話番号 03-3581-1101 内線 3492